

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-175685
 (43)Date of publication of application : 27.06.2000

(51)Int.Cl. C12N 15/09
 C12N 1/21
 C12N 9/06
 // (C12N 15/09
 C12R 1:07)
 (C12N 1/21
 C12R 1:19)
 (C12N 9/06
 C12R 1:19)

(21)Application number : 10-354482
 (22)Date of filing : 14.12.1998

(71)Applicant : KIKKOMAN CORP
 (72)Inventor : ICHIKAWA TOSHIO
 KOYAMA TAIJI

(54) SARCOSINEOXIDASE AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a sarcosineoxidase showing a high reactivity in a neutral range and to provide a method for producing the same.

SOLUTION: This sarcosineoxidase has following physicochemical properties. (a) Activity: it hydrolyzes 1 mol sarcosine oxidatively to form 1 mol glycine, 1 mol formaldehyde and 1 mol hydrogen peroxide. (b) Substrate specificity: it has a substrate specificity to sarcosine. (c) Optimal pH: 7.0-8.0 (d) Stable pH range: 7.0-9.5 (e) Range of a suitable temperature for its activity: 50° C (f) Thermal stability: ≤55° C (g) Molecular weight: 44,000 (roughly calculated from a wild type amino acid sequence) The enzyme is obtained by culturing a microorganism having a sarcosineoxidase production capability and recovering it from the cultured medium. By the present invention, it is possible to produce the sarcosineoxidase showing a relatively high reactivity in a neutral to weakly acidic range, hardly receiving an effect of bilirubin in measuring creatinine in a good efficiency, and also it is possible to perform a sufficient reaction by using a smaller using amount of the enzyme even in using it under a usual conditions.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 14.06.2002
 [Date of sending the examiner's decision of rejection] 01.03.2005

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ ⑫ Offenlegungsschrift
⑯ ⑯ DE 199 60 271 A 1

⑯ Int. Cl. 7:
C 12 N 9/02

⑯ Aktenzeichen: 199 60 271.9
⑯ Anmeldetag: 14. 12. 1999
⑯ Offenlegungstag: 27. 7. 2000

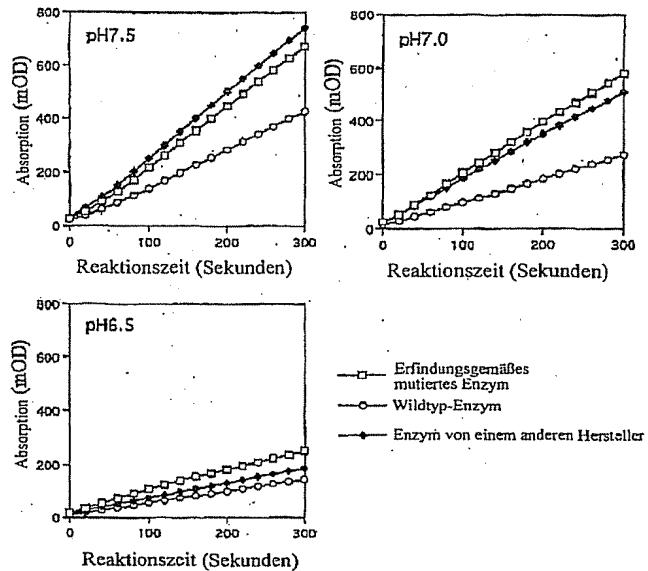
⑯ Unionspriorität:
354482/98 14. 12. 1998 JP
⑯ Anmelder:
Kikkoman Corp., Noda, Chiba, JP
⑯ Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

⑯ Erfinder:
Ichikawa, Toshio, Noda, Chiba, JP; Koyama, Yasuji,
Noda, Chiba, JP

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑯ Sarcosinoxidase und Verfahren zu deren Herstellung

⑯ Diese Erfindung betrifft eine Sarcosinoxidase mit den folgenden physikalisch-chemischen Eigenschaften: (a) Wirkungsweise: oxidatives Hydrolysieren von 1 Mol Sarcosin, wobei 1 Mol Glycin, 1 Mol Formaldehyd und 1 Mol Wasserstoffperoxid erhalten werden; (b) Substratspezifität: spezifisch für Sarcosin; (c) pH-Optimum: 7,0-8,0; (d) stabiler pH-Bereich: 7,0-9,5; (e) geeigneter Temperaturbereich für die Wirkung: 50°C; (f) Hitzebeständigkeit: 55°C oder weniger und (g) Molekulargewicht: 44000 Daltons (durch Abschätzung aus der Aminosäuresequenz des Wildtyps) und ein Verfahren zur Herstellung der Sarcosinoxidase, umfassend die Schritte der Züchtung eines Mikroorganismus mit der Fähigkeit, die Sarcosinoxidase zu produzieren und der Gewinnung der Sarcosinoxidase aus der Kultur.



Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Sarcosinoxidase, die eine hohe Reaktivität unter neutralen Bedingungen zeigt, und ein Verfahren zur Herstellung der Sarcosinoxidase.

5 Sarcosinoxidase ist ein Enzym, das eine Reaktion katalysiert, um Sarcosin oxidativ zu hydrolysieren, wobei Glycin, Formaldehyd und Wasserstoffperoxid erzeugt werden. Dieses Enzym kann zur Bestimmung von Creatinin- oder Creatinmengen in menschlichen Serum- oder Urinproben in Kombination mit Creatininase oder Creatinase verwendet werden und ist daher als ein diagnostisches Enzym für eine Vielzahl von Krankheiten wie eine Lebererkrankung nützlich.

10 Herkömmliche Sarcosinoxidasen weisen Nachteile, wie eine drastisch verringerte Reaktivität unter neutralen bis schwach sauren Bedingungen auf. Demgemäß wurden sie im allgemeinen unter schwach alkalischen Bedingungen verwendet. Vgl. JP-B-1-34035, JP-A-5-115281, JP-A-8-238087, JP-A-6-113840 und JP-A-4-94688. Wenn sie jedoch mit Seren umgesetzt werden, reagieren solche Sarcosinoxidasen im optimalen pH-Bereich gut mit dem Substrat, werden aber durch Bilirubin leicht beeinflußt, was Fehler in Tests hervorruft.

15 Wenn dagegen Sarcosinoxidase mit Seren bei einem pH-Wert von etwa 6,5 umgesetzt werden kann, wird sie durch Bilirubin nicht beeinflußt und ruft folglich keine Fehler hervor. Demgemäß bestand immer ein Bedarf für eine Sarcosinoxidase, die unter neutralen bis schwach sauren Bedingungen verwendet werden kann.

20 Außerdem ist die Verwendung eines solchen Enzyms mit einer erhöhten Reaktivität unter schwach alkalischen Bedingungen (d. h. niedrigem Km-Wert) sehr wirtschaftlich, da eine geringere Menge des Enzyms eine ausreichende Reaktion ergeben kann, wenn es als ein diagnostisches Enzym unter normalen Bedingungen verwendet wird.

25 Ein Ziel der Erfindung ist, eine Sarcosinoxidase mit einer hohen Reaktivität unter neutralen Bedingungen bereitzustellen.

Ein anderes Ziel der Erfindung ist, ein Verfahren zur Herstellung der Sarcosinoxidase bereitzustellen.

30 Der vorliegenden Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß eine genetische Mutation eines von *Bacillus sp. NS-129* abstammenden Sarcosinoxidase-Gens (wie in JP-B-6-65303 offenbart) eine mutierte Sarcosinoxidase ergab, die nicht nur eine höhere Reaktivität (d. h. kleineren Km-Wert) als die einer Wildtyp-Sarcosinoxidase unter schwach alkalischen Bedingungen zeigen kann, sondern auch eine relativ höhere Reaktivität unter neutralen Bedingungen (pH 7,0) bei behält.

35 Folglich betrifft die vorliegende Erfindung eine Sarcosinoxidase, die die folgenden physikalisch-chemischen Eigenschaften besitzt:

30 (a) Wirkungsweise: oxidatives Hydrolysieren von 1 Mol Sarcosin, wobei 1 Mol Glycin, 1 Mol Formaldehyd und 1 Mol Wasserstoffperoxid erhalten werden;
 (b) Substratspezifität: spezifisch für Sarcosin;
 (c) pH-Optimum: 7,0–8,0;
 35 (d) stabiler pH-Bereich: 7,0–9,5;
 (e) geeigneter Temperaturbereich für die Wirkung: 50°C;
 (f) Thermostabilität: 55°C oder weniger; und
 (g) Molekulargewicht: 44.000 Daltons (bei der annähernden Abschätzung aus der Aminosäuresequenz des Wildtyps).

40 In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform ist die Sarcosinoxidase aus *E. coli* JM109 (pSO12 EH) (Hinterlegungsnr. FERM BP-6597) oder einer davon abstammenden Variante erhältlich.

45 Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Sarcosinoxidase, umfassend die Schritte der Züchtung eines Mikroorganismus mit der Fähigkeit die Sarcosinoxidase zu produzieren, und Gewinnung der Sarcosinoxidase aus der Kultur.

In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform ist der Mikroorganismus *E. coli* JM109 (pSO12 EH) (Hinterlegungsnr. FERM BP-6597) oder eine davon abstammende Variante.

50 Der hier verwendete Begriff "Variante" bezeichnet einen mutierten Stamm von *E. coli* JM109 (pSO12 EH), der in der Lage ist, eine Sarcosinoxidase mit den vorstehend beschriebenen physikalisch-chemischen Eigenschaften zu produzieren.

55 Diese Beschreibung schließt einen Teil oder alle der in der Beschreibung und/oder den Zeichnungen der Japanischen Patentanmeldung Nr. 10-354482, die eine Prioritätsanmeldung der vorliegenden Anmeldung ist, offengelegten Inhalte ein.

55 Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 ist ein Diagramm, das das pH-Optimum des erfindungsgemäßen Enzyms zeigt.

Fig. 2 ist ein Diagramm, das den geeigneten Temperaturbereich für die Reaktion des erfindungsgemäßen Enzyms zeigt.

60 Fig. 3 ist ein Diagramm, das den geeigneten pH-Bereich für die Stabilität des erfindungsgemäßen Enzyms zeigt.

Fig. 4 ist ein Diagramm, das die Thermostabilität des erfindungsgemäßen Enzyms zeigt.

Fig. 5 ist ein Diagramm, das den Vergleich der Reaktivität zwischen dem erfindungsgemäßen mutierten Enzym, dem Wildtyp-Enzym und einer im Handel von einem anderen Hersteller erhältlichen bestimmten Sarcosinoxidase zeigt.

Die vorliegende Erfindung wird nachstehend ausführlich beschrieben.

65 Die erfindungsgemäße Sarcosinoxidase kann erhalten werden, zum Beispiel wie nachstehend beschrieben.

Zuerst wird rekombinantes Plasmid pSO12-DNA, die ein aus einem isolierten *Bacillus sp. NS-129*-Stamm stammendes Sarcosinoxidase-Gen enthält (Agricultural and Biological Chemistry 55(5) (1991), 1259–1263), extrahiert und aus *E. coli* JM109 (pSO12) unter Verwendung von QIAGEN (Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan) gereinigt.

Vektor-DNAs, die erfindungsgemäß verwendet werden können, sind nicht auf die vorstehend beschriebene Plasmidvektor-DNA begrenzt, sondern schließen weiterhin zum Beispiel Bakteriophagenvektor-DNAs und jegliche andere Plasmidvektor-DNAs ein. Insbesondere wird pUC18 (Takara Shuzo Co., Ltd., Kyoto, Japan) bevorzugt.

Anschließend kann jegliches Verfahren angewendet werden, um ein Sarcosinoxidase-Gen zu erhalten, das ein Protein mit einer Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1, aber mit Deletionen, Substitutionen oder Additionen von einer oder mehreren Aminosäuren darin; und mit einer Sarcosinoxidase-Aktivität, vorzugsweise einer relativ hohen Reaktivität unter neutralen bis schwach sauren Bedingungen, codiert. Beispiele eines solchen Verfahrens umfassen die Zufallspunktmutation der vorstehend beschriebenen rekombinanten Plasmid-DNA, die erzeugt wird durch Verwendung chemischer Mutagenesemittel, wie Hydroxylamin oder salpetrige Säure, oder durch PCR-Verfahren; die gut bekannte ortsspezifische Mutagenese der rekombinanten Plasmid-DNA, wobei ortsspezifische Mutationen wie Substitutionen oder Deletionen durch Verwendung eines im Handel erhältlichen Kits erzeugt werden; und die Oligonucleotid-Mutagenese, ein Verfahren, das die Schritte der selektiven Spaltung der rekombinanten Plasmid-DNA, Entfernung oder Addition eines oder mehrerer ausgewählter Oligonucleotide und dann die Ligierung der DNA umfaßt.

Die wie vorstehend beschrieben behandelten rekombinanten DNAs können durch Verwendung von zum Beispiel einer Entsalzungssäule oder QIAGEN (Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan) gereinigt werden, um verschiedene rekombinante DNAs zu erhalten.

Die auf diese Weise erhaltene rekombinante DNA kann verwendet werden, um eine Transformante oder Transfektante, die eine rekombinante DNA umfaßt, enthaltend ein beliebiges Fragment des Sarcosinoxidase-Gens, durch Transformieren oder Transfizieren von zum Beispiel *E. coli* K12, vorzugsweise *E. coli* JM109 (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan), oder XL1-Blue (Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan) zu erhalten.

Durch Transformation kann zum Beispiel ein Stamm, der eine Sarcosinoxidase mit der gewünschten Eigenschaft produziert (d. h. eine hohe Reaktivität in einem neutralen pH-Bereich), aus der so erhaltenen Transformante (die eine rekombinante Plasmid-DNA umfaßt, enthaltend ein mutiertes Sarcosinoxidase-Gen) durch das folgende Verfahren erhalten werden:

Jede Kolonie der erhaltenen Transformante wird in einem Flüssigmedium wie TY-Medium (supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin und 1 mM IPTG) gezüchtet, um verschiedene mutierte Sarcosinoxidasen zu induzieren, die von den rekombinanten Plasmid-DNAs codiert werden. Nach der Züchtung wird die Kultur einer Ultraschallbehandlung unterzogen und die rohe Enzymextraktlösung wird in Bezug auf ihre Sarcosinoxidase-Aktivität klassifiziert. Die 100 mE entsprechende Menge der rohen Enzymlösung wird aus dem erhaltenen Aktivitätswert berechnet. Dann läßt man das Rohenzym der 100 mE entsprechende Menge mit 0,5 mM Sarcosin in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) reagieren. Jede Variante wird extrahiert und in Bezug auf ihren Aktivitätswert klassifiziert, der mit dem des Wildtyp-Proteins verglichen wird, um eine Transformante von Interesse auszuwählen.

Durch Verwendung einer wie vorstehend beschrieben hergestellten Transformante oder Transfektante, die die Fähigkeit besitzt, eine Sarcosinoxidase zu produzieren, die eine hohe Reaktivität in einem neutralen pH-Bereich zeigt, und vorzugsweise unter Verwendung einer zur Gattung *Escherichia* gehörenden Transformante oder Transfektante kann eine Sarcosinoxidase, die eine hohe Reaktivität in einem neutralen pH-Bereich zeigt, wie folgt hergestellt werden: Eine Standardfeststoffkultur kann verwendet werden, um den vorstehend beschriebenen Mikroorganismus zu züchten, obwohl eine Flüssigkultur bevorzugt wird.

Beispiele von Medien zur Züchtung des vorstehend beschriebenen Mikroorganismus schließen solche ein, die ein oder mehrere anorganische Salze, wie Kaliumdihydrogenphosphat, Dikaliumhydrogenphosphat, Magnesiumsulfat, Eisen(III)-chlorid, Eisen(III)-sulfat und Mangansulfat, zusammen mit einer oder mehreren Stickstoffquellen, wie Hefeextrakt, Pepton, Fleischextrakt, Maisquellwasser und Exsudat von Sojabohne oder Weizenkoji, enthalten. Saccharinmaterialien, Vitamine und ähnliches können gegebenenfalls zugegeben werden.

Der anfängliche pH-Wert des Mediums kann in geeigneter Weise auf einen Wert von 7–9 eingestellt werden. Der Mikroorganismus kann vorzugsweise bei einer Temperatur von 30–42°C und vorzugsweise etwa 37°C für einen Zeitraum von 6–24 Stunden durch zum Beispiel submerse Belüftungskultur, Schüttelkultur oder Standkultur gezüchtet werden. Nach der Züchtung kann die Sarcosinoxidase aus der Kultur durch übliche Enzymgewinnungsverfahren gewonnen werden.

Die Zellen werden von der Kultur durch Filtration, Zentrifugation und ähnliches getrennt und dann gewaschen. Vorzugsweise kann die Sarcosinoxidase aus den Zellen gewonnen werden. In diesem Fall können die Zellen per se verwendet werden. In einer anderen Ausführungsform kann die Sarcosinoxidase vorzugsweise aus den Zellen durch zum Beispiel Aufbrechen der Zellen unter Verwendung von beliebigen Mitteln wie einem Ultraschall-Disruptionsgerät, einer "French Press", "Diner Mill" und ähnlichen, Lyse der Zellwände unter Verwendung eines die Zellwand lysierenden Enzyms wie Lysozym oder Extraktion des Enzyms aus den Zellen mit Tensiden wie Triton X-100 gewonnen werden.

Nützliche Verfahren zur Reinigung eines Enzyms können angewendet werden, um die Sarcosinoxidase aus der wie vorstehend beschrieben erhaltenen rohen Enzymlösung zu isolieren. Zum Beispiel können eine Ammoniumsulfatfällung, organische Lösungsmittelfällung, Ionenauftauscherchromatographie, Gelfiltrationschromatographie, Absorptionsschomatographie und Elektrophorese allein oder in Kombination miteinander verwendet werden.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Sarcosinoxidase sind wie folgt:

1) Wirkungsweise

Dieses Enzym hydrolysiert oxidativ 1 Mol Sarcosin, wobei 1 Mol Glycin, 1 Mol Formaldehyd und 1 Mol Wasserstoffperoxid hergestellt werden;

2) Substratspezifität

Dieses Enzym ist für Sarcosin spezifisch;

3) pH-Optimum

Die relative Reaktivität des Enzyms wurde bei 37°C für 10 Minuten unter verschiedenen pH-Bedingungen in 50 mM MES-Puffer (pH 5,5–7,0), 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,5–8,0), 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0–8,5) und

DE 199 60 271 A 1

50 mM CAPS-Puffer (pH 9,0–9,5) bestimmt. Die relativen Aktivitäten sind in **Fig. 1** gezeigt, aus der sich ergibt, daß das pH-Optimum des Enzyms in einem Bereich von pH 7,0–8,0 liegt.

4) Geeignete Temperatur für die Wirkung

Die Reaktivität des Enzyms wurde bei verschiedenen Temperaturen in einer Reaktionslösung bestimmt, umfassend die gleichen Zusammensetzungen wie die, die in dem nachstehend beschriebenen Test zu verwenden sind. Die Ergebnisse sind in **Fig. 2** gezeigt, aus der sich ergibt, daß die geeignete Temperatur zur Umsetzung des Enzyms 50°C beträgt.

5) Stabiler pH-Bereich des Enzyms

Die pH-Stabilität des Enzyms wurde bei 20°C für 20 Stunden bei pH 6,0–11,0 in 50 mM MES-Puffer (pH 6,0–8,0),

10 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0–8,0), 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0–9,0), 50 mM CHES-Puffer (pH 9,0–10,0) und 50 mM CAPS-Puffer (pH 10,0–11,0) getestet. Die Ergebnisse sind in **Fig. 3** gezeigt, aus der sich ergibt, daß der stabile pH-Bereich pH 7,0–9,5 ist.

6) Hitzestabilität

15 Die Hitzestabilität des Enzyms wurde in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,7) bei verschiedenen Temperaturen 10 Minuten getestet. Die Ergebnisse sind in **Fig. 4** gezeigt, aus der sich ergibt, daß das Enzym bei einer Temperatur von bis zu etwa 55°C stabil ist.

7) Enzymtest

20 0,25 M Phosphatpuffer (0,1 ml, pH 7,7), 0,2 M Sarcosinlösung (0,3 ml) und die Enzimlösung mit der geeigneten Konzentration (0,1 ml) wurden gemischt und bei 37°C 10 Minuten umgesetzt. Dann wurde 1,0 N Essigsäurelösung (0,5 ml) zu dem Gemisch zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Zu dem Gemisch wurden 3 ml Acetylaceton-Farbtwicklungsösung (Acetylaceton, 0,2% (Vol./Vol.) und Diammoniumhydrogenphosphat, 10% (Gew./Vol.)) (pH 6,5), zugegeben, um den Farbstoff bei 37°C für 40 Minuten zu entwickeln. Die Absorption wurde bei 410 nm durch ein Spektralphotometer bestimmt. Dann wurde die Ausbeute des Enzyms aus der vorher hergestellten Kalibrierungskurve von Formaldehyd bestimmt. Die Menge des Enzyms, die 1 µMol Formaldehyd pro Minute bei 37°C erzeugt, wurde als 1 Einheit definiert.

8) Km-Wert

Der Km-Wert des Enzyms wurde unter Verwendung des vorstehend beschriebenen Tests bestimmt. Aus einem Linneweaver-Burk-Diagramm ergab sich ein Km-Wert von etwa 3,5 mM (für Sarcosin).

9) Reaktivität unter neutralen Bedingungen

30 Da das mutierte Enzym eine höhere Reaktivität als andere Sarcosinoxidasen unter neutralen Bedingungen (pH 7,0) zeigt, wurde die Reaktivität von 30 mE/ml Enzym mit 0,5 mM Substrat (Sarcosin) mit der einer im Handel erhältlichen Sarcosinoxidase verglichen, die einen Km-Wert aufwies, der zu dem Enzym praktisch äquivalent war, und die eine große Homologie zu dem Enzym aufwies. Die Ergebnisse sind in **Fig. 5** gezeigt. Das vorliegende mutierte Enzym zeigt eine relativ geringere Reaktivität als die der im Handel erhältlichen Sarcosinoxidase, aber eine außergewöhnlich höhere Reaktivität als die des Wildtyps unter schwach alkalischen Bedingungen, während es eine höhere Reaktivität unter neutralen bis schwach sauren Bedingungen (pH 7,0–6,5) zeigte.

10) Molekulargewicht

Dieses Enzym weist ein Molekulargewicht von 44.000 Daltons auf (durch Abschätzung aus der Aminosäuresequenz des Wildtyps).

40

Beispiele

Bestimmte Beispiele der vorliegenden Erfindung werden nachstehend beschrieben.

45

Beispiel 1

(1) Herstellung rekombinanter Plasmid pSO12-DNA

50 E. coli JM109 (pSO12) (Agricultural and Biological Chemistry 55(5) (1991), 1259–1263) wurde in 20 ml TY-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,25% NaCl, pH 7,5) beimpft und durch Schüttelkultur bei 37°C 18 Stunden gezüchtet. Die Kultur wurde bei 6.000 UpM 10 Minuten zentrifugiert, um die Zellen zu gewinnen. Rekombinante Plasmid pSO12-DNA wurde extrahiert und aus den Zellen unter Verwendung von QIAGEN-Tip-100 (Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan) gereinigt, wobei 70 µg rekombinante Plasmid pSO12-DNA erhalten wurden.

55

(2) Mutagenese

60 2 µg der vorstehend erhaltenen rekombinanten Plasmid-DNA wurden verwendet, um XL1-RED-Zellen (STRATAGENE Co., USA) (die mit größerer Wahrscheinlichkeit einen Fehler bei der Plasmidreplikation erzeugen und folglich mit größerer Wahrscheinlichkeit eine Mutation erzeugen) gemäß dem Verfahren von Morrison D. M. (Method in Enzymology 68 (1979), 326–331) zu transformieren, wobei etwa 1500 Kolonien der Transformante erhalten wurden, von denen 500 Kolonien jeweils in 20 ml TY-Medium beimpft und bei 37°C 18 Stunden durch Schüttelkultur gezüchtet wurden. Die Kultur wurde bei 6000 UpM 10 Minuten zentrifugiert, um die Zellen zu gewinnen. Dann wurde das Plasmid pSO12 extrahiert und aus den Zellen unter Verwendung von QIAGEN-Tip-100 (Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan) gereinigt, wobei 70 µg mutierte rekombinante Plasmid pSO12-DNA erhalten wurden, von denen 5 µg verwendet wurden, um den E. coli JM109-Stamm (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) gemäß dem Verfahren von Morrison D. M. (a.a.O.) zu transformieren, wobei etwa 2000 Transformanten erhalten wurden, die mutierte Plasmide enthielten. E. coli JM109 (pSO12 EH), das eine Sarcosinoxidase mit einer hohen Reaktivität in einem neutralen pH-Bereich produziert, wurde

DE 199 60 271 A 1

durch Durchmusterung unter neutralen Bedingungen (pH 7,0) gemäß dem nachstehend in (3) beschriebenen Verfahren erhalten.

(3) Durchmusterung einer Variante, die eine hohe Reaktivität in einem neutralen pH-Bereich zeigt

Zuerst wurde jede Kolonie der vorstehend erhaltenen Transformanten in einem Flüssigmedium, 2 ml TY-Medium (supplementiert mit 50 µg Ampicillin und 1 mM IPTG), gezüchtet und verschiedene Sarcosinoxidasen, die von den Plasmiden codiert werden, wurden induziert, so daß sie produziert wurden. Anschließend wurde die Kultur einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Die so erhaltene rohe Enzymextraktlösung wurde in Bezug auf ihre Reaktivität bei pH 7,0 klassifiziert. Der erhaltene Wert wurde verwendet, um eine 100 mE entsprechende Menge der rohen Enzymlösung zu berechnen. Die rohe Enzymlösung einer 100 mE entsprechende Menge ließ man mit 0,5 mM Substrat (Sarcosin) reagieren, um deren Reaktivität zu bestimmen. In ähnlicher Weise wurde jede der anderen Varianten extrahiert und deren Reaktivität wurde mit der der Wildtyp-Sarcosinoxidase verglichen. Eine Variante, die das Ziel der vorliegenden Erfindung erfüllt, wurde ausgewählt, und eine Sarcosinoxidase, die eine hohe Reaktivität in einem neutralen pH-Bereich zeigte, wurde aus der ausgewählten Variante *E. coli* JM109 (pSO12 EH) erhalten. *E. coli* JM109 (pSO12 EH) wurde gemäß dem Budapest-Vertrag beim National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan) als FERM BP-6597 am 11. Dezember 1998 hinterlegt.

Beispiel 2

Die vorstehend erhaltene Variante, d. h. *E. coli* JM109 (pSO12 EH), wurde in 100 ml 1 mM Isopropyl- β -D-galactosid-enthaltendem TY-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,25% NaCl, pH 7,5) verteilt in Sakaguchi-Kolben 16 Stunden durch Schüttelkultur gezüchtet und dann in 20 l eines in ähnlicher Weise hergestellten TY-Mediums in einem 30 l-Kulturgefäß flammenbeimpft. Nach dem Beimpfen wurde der *E. coli*-Stamm bei 450 UpM, 20 l Luft/min und 37°C etwa 20 Stunden gezüchtet.

Nach der Züchtung wurden die Zellen aus 20 l der Kultur durch eine Microzer-Vorrichtung (PW-303, erhältlich von Asahi Chemical Industry Co., Ltd., Osaka, Japan) gewonnen, in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) gewaschen und in 10 l des gleichen Phosphatpuffers suspendiert.

Zwanzig Gramm Lysozym (in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, 100 ml) und 110,55 M EDTA (pH 8,0) wurden zu 10 l der vorstehend beschriebenen Zellsuspension zugegeben, gemischt, bei 30°C über Nacht stehengelassen und dann mit 500 ml 5%iger Protaminlösung (pH 8,0) tropfenweise unter Rühren versetzt, um Nucleinsäuren zu entfernen. Die wässrige Phase wurde gegen 10 mM Phosphatpuffer (pH 8,0) (nachstehend bezeichnet als "Puffer A") dialysiert.

Nachdem etwa 3 kg (bezogen auf die Feuchtmasse) DEAE-Cellulose zu etwa 28 l des Dialysats zugegeben und eingemischt wurden, um zu ermöglichen, daß die Sarcosinoxidase daran adsorbiert wird, wurde die DEAE-Cellulose mit Puffer A, enthaltend 5% Glycerin und 0,05% 2-Mercaptoethanol, gewaschen. Dann wurde die Sarcosinoxidase mit 0,5 M KCl enthaltendem Puffer A vor der Ultrafiltration und Konzentration eluiert.

Etwa 1,0 kg (Feuchtmasse) DEAE-Sepharose CL-4B wurde zu der vorstehend beschriebenen konzentrierten Lösung (etwa 1,0 l) zugegeben und eingemischt, um zu ermöglichen, daß die Sarcosinoxidase daran adsorbiert wird. Die DEAE-Sepharose CL-4B wurde mit 0,05 M KCl enthaltendem Puffer A gewaschen und die Sarcosinoxidase wurde mit Puffer A, enthaltend 0,3 M KCl, vor der Ultrafiltration und Konzentration eluiert.

Anschließend wurde ein Teil der rohen Enzymlösung an eine mit Puffer A äquilierte QAE-Sephadex A-50-Säule (6,0 x 30 cm) adsorbiert und mit einem Gradienten von Puffer A zu 0,4 M Kaliumchlorid enthaltendem Puffer A eluiert, wobei eine die Sarcosinoxidase enthaltende gelbe Fraktion erhalten wurde.

Nach Extrafiltration und Konzentration der Sarcosinoxidase-enthaltenden Fraktion wurde das Konzentrat gefriertrocknet, wobei etwa 1 g der gereinigten, pulverförmigen Sarcosinoxidase erhalten wurde.

Vorteilhafte Wirkung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung kann ein Verfahren für die effiziente Herstellung einer Sarcosinoxidase, die eine hohe Reaktivität in einem neutralen pH-Bereich zeigt und folglich industriell verwendbar ist, bereitstellen.

Alle Veröffentlichungen einschließlich der hier angeführten Patente und Patentanmeldungen sind hier unter Bezugnahme in ihrer Gesamtheit eingeschlossen.

Die hier beschriebene Sequenz von SEQ ID Nr. 1 wird nachstehend angegeben.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 199 60 271 A 1

Met Ser Thr His Phe Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser Met Gly
 1 5 10 15
 5 Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ala Lys Gln Gly Val Lys Thr Leu Leu
 20 25 30
 Val Asp Ser Phe Asp Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His Gly Asp
 35 40 45
 10
 Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr Val Pro
 50 55 60
 15 Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Thr
 65 70 75 80
 His His Lys Ile Phe Thr Gln Thr Gly Val Leu Val Tyr Gly Pro Lys
 85 90 95
 20 Gly Gly Ser Ala Phe Val Ser Glu Thr Met Glu Ala Ala Asn Ile His
 100 105 110
 Ser Leu Glu His Glu Leu Phe Gln Gly Lys Gln Leu Thr Asp Arg Trp
 115 120 125
 25 Ala Gly Val Glu Val Pro Asp Asn Tyr Glu Ala Ile Phe Glu Pro Asn
 130 135 140
 Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Gln Ala Tyr Arg Glu Leu
 145 150 155 160
 30 Ala Glu Ala His Gly Ala Thr Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val Glu Asp
 165 170 175
 Phe Glu Val Thr Glu Asp Leu Val Thr Ile Lys Thr Ala Lys Gly Ser
 180 185 190
 Tyr Thr Ala Asn Lys Leu Val Val Ser Met Gly Ala Trp Asn Ser Lys
 195 200 205
 35 Leu Leu Ser Lys Leu Asp Val Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr Arg Gln
 210 215 220
 Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Ala Lys Tyr Ser Asn Asn Ala
 225 230 235 240
 40 His Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Glu Asn Gly Ile Tyr Tyr Gly
 245 250 255
 Phe Pro Ser Phe Gly Ser Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His Ser Tyr
 260 265 270
 45 Gly Gln Gln Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly Ala Tyr
 275 280 285
 Pro Glu Asp Glu Ala Asn Leu Arg Lys Phe Leu Glu Gln Tyr Met Pro
 290 295 300
 50 Gly Ala Asn Gly Glu Leu Lys Lys Gly Ala Val Cys Met Tyr Thr Lys
 305 310 315 320
 Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Lys Tyr Ser Asn
 325 330 335
 55 Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe Ser Ser
 340 345 350
 Val Val Gly Glu Thr Leu Ala Gln Leu Ala Thr Thr Gly Lys Thr Glu
 355 360 365
 60 His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Leu Asn Arg Asp Ala Leu Lys Lys Glu
 370 375 380
 Ala Val Lys
 385

DE 199 60 271 A 1

Sequenzprotokoll

<110> KIKKOMAN CORPORATION

<120> Sarcosinoxidase und Verfahren zu deren Herstellung 5

<130> D 2757 DE

<140>

<141>

10

<150> JP10-354482

<151> 1998-12-14

<160> 1

15

<210> 1

<211> 387

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

20

<400> 1

Met Ser Thr His Phe Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser Met Gly
1 10 15

25

Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ala Lys Gln Gly Val Lys Thr Leu Leu
20 25 30Val Asp Ser Phe Asp Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His Gly Asp
35 40 45

30

Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr Val Pro
50 55 60Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Thr
65 70 75 80

35

His His Lys Ile Phe Thr Gln Thr Gly Val Leu Val Tyr Gly Pro Lys
85 90 95Gly Gly Ser Ala Phe Val Ser Glu Thr Met Glu Ala Ala Asn Ile His
100 105 110Ser Leu Glu His Glu Leu Phe Glu Gly Lys Gln Leu Thr Asp Arg Trp
115 120 125

40

Ala Gly Val Glu Val Pro Asp Asn Tyr Glu Ala Ile Phe Glu Pro Asn
130 135 140Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Gln Ala Tyr Arg Glu Leu
145 150 155 160

45

Ala Glu Ala His Gly Ala Thr Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val Glu Asp
165 170 175Phe Glu Val Thr Glu Asp Leu Val Thr Ile Lys Thr Ala Lys Gly Ser
180 185 190

50

Tyr Thr Ala Asn Lys Leu Val Val Ser Met Gly Ala Trp Asn Ser Lys
195 200 205Leu Leu Ser Lys Leu Asp Val Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr Arg Gln
210 215 220

55

Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Ala Lys Tyr Ser Asn Asn Ala
225 230 235 240His Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Glu Asn Gly Ile Tyr Tyr Gly
245 250 255

60

Phe Pro Ser Phe Gly Gly Ser Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His Ser Tyr
260 265 270Gly Gln Gln Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly Ala Tyr
275 280 285

65

Pro Glu Asp Glu Ala Asn Leu Arg Lys Phe Leu Glu Gln Tyr Met Pro
290 295 300Gly Ala Asn Gly Glu Leu Lys Lys Gly Ala Val Cys Met Tyr Thr Lys
305 310 315 320

15 Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Lys Tyr Ser Asn
325 330 335
Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe Ser Ser
5 340 345 350
Val Val Gly Glu Thr Leu Ala Gln Leu Ala Thr Thr Gly Lys Thr Glu
355 360 365
His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Leu Asn Arg Asp Ala Leu Lys Lys Glu
370 375 380
10 Ala Val Lys
385

Patentansprüche

15 1. Sarcosinoxidase mit den folgenden physikalisch-chemischen Eigenschaften:
(a) Wirkungsweise: oxidatives Hydrolyseren von 1 Mol Sarcosin, wobei 1 Mol Glycin, 1 Mol Formaldehyd und 1 Mol Wasserstoffperoxid erhalten werden;
(b) Substratspezifität: spezifisch für Sarcosin;
20 (c) ph-Optimum: 7,0–8,0;
(d) stabiler ph-Bereich: 7,0–9,5;
(e) geeignete Temperatur für die Wirkung: 50°C;
(f) Hitzestabilität: 55°C oder weniger; und
(g) Molekulargewicht: 44.000 Daltons (durch Abschätzung aus der Aminosäuresequenz des Wildtyps).
25 2. Sarcosinoxidase nach Anspruch 1, wobei die Sarcosinoxidase erhältlich ist aus E. coli JM109 (pSO12 EH) (Hinterlegungsnr. FERM BP-6597) oder einer davon stammenden Variante.
3. Verfahren zur Herstellung der Sarcosinoxidase, umfassend die Schritte der Züchtung eines Mikroorganismus mit der Fähigkeit, die Sarcosinoxidase nach Anspruch 1 zu produzieren, und der Gewinnung der Sarcosinoxidase aus der Kultur.
30 4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Mikroorganismus E. coli JM109 (pSO12 EH) (Hinterlegungsnr. FERM BP-6597) oder eine davon abstammende Variante ist.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

FIG.1

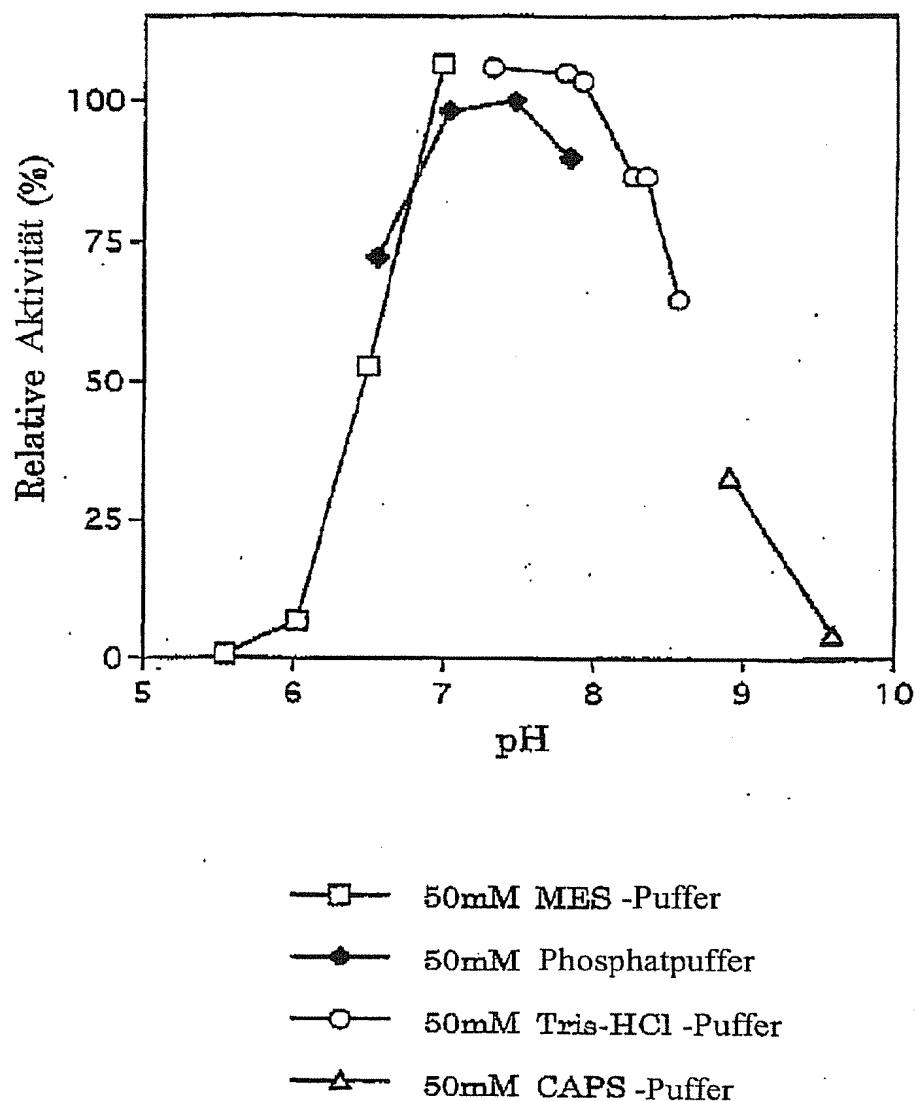


FIG.2

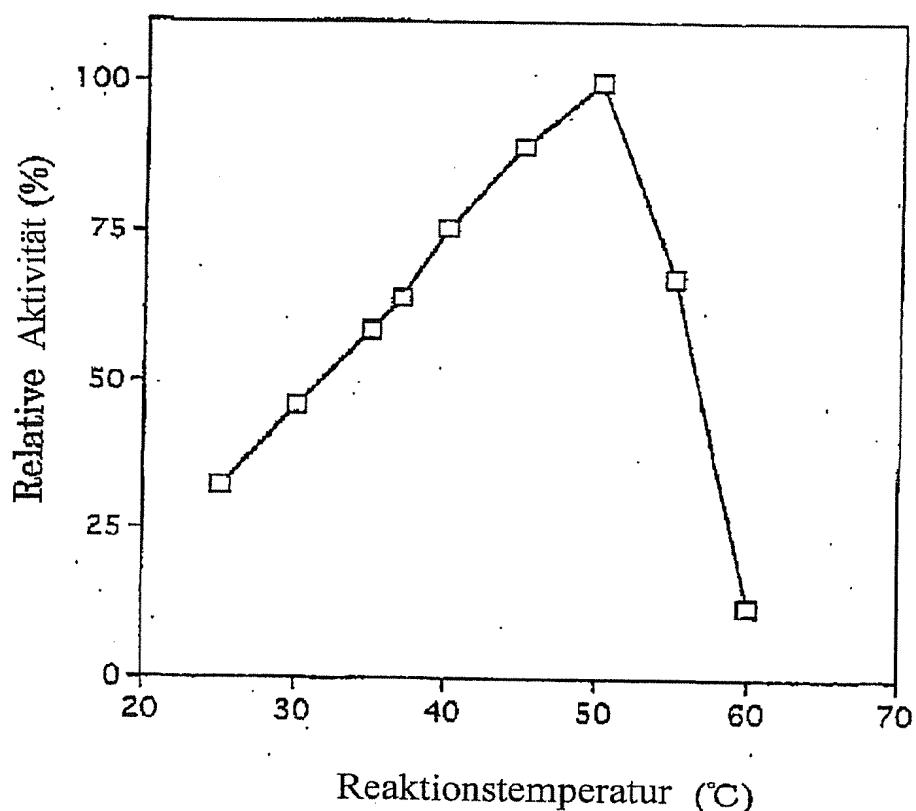


FIG. 3

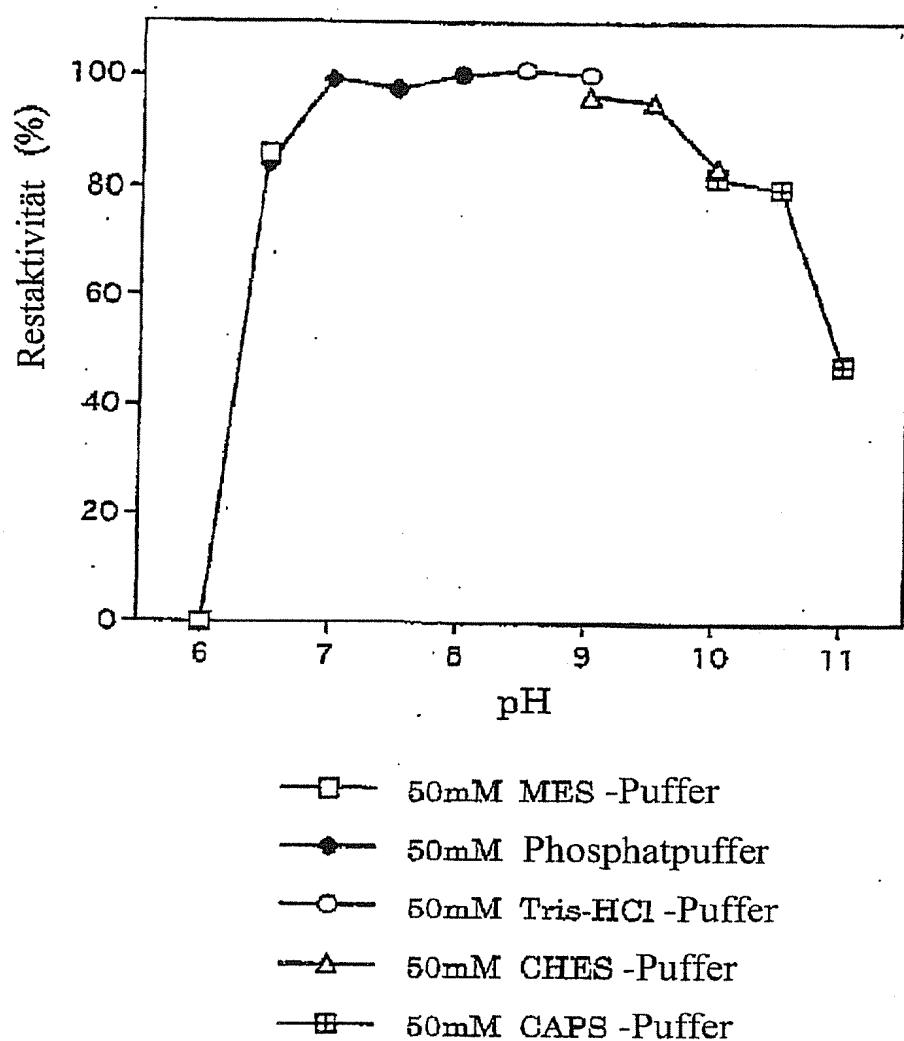


FIG.4

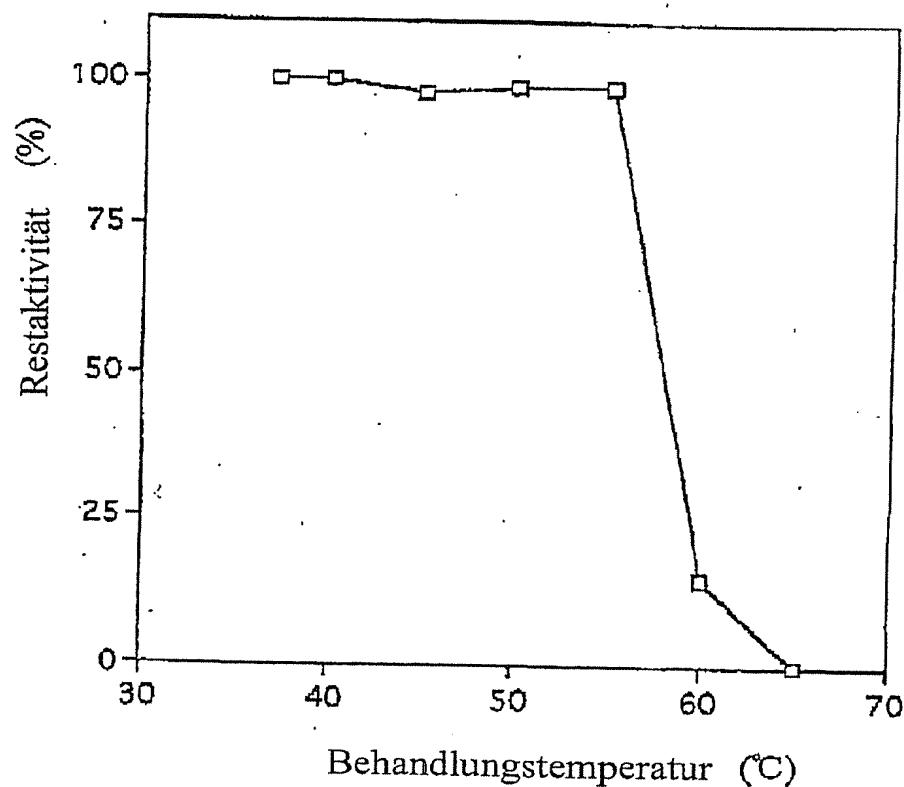


FIG.5

